Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019763

International filing date: 24 December 2004 (24.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP

Number: 2003-430555

Filing date: 25 December 2003 (25.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 17 February 2005 (17.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in

compliance with Rule 17.1(a) or (b)



24.12.2004

日本国特許庁 JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application:

2003年12月25日

出 願 番 号

特願2003-43055

Application Number:

[JP2003-430555]

出 願 人
Applicant(s):

[ST. 10/C]:

キヤノン株式会社

特許庁長官 Commissioner, Japan Patent Office 2005年 2月 3日





特許願 【書類名】 258739 【整理番号】 平成15年12月25日 【提出日】 特許庁長官 殿 【あて先】 C12Q 1/68 【国際特許分類】 【発明者】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内 【住所又は居所】 塚田 護 【氏名】 【特許出願人】 【識別番号】 000001007 キヤノン株式会社 【氏名又は名称】 【代理人】 100123788 【識別番号】 【弁理士】 宮崎 昭夫 【氏名又は名称】 03-3585-1882 【電話番号】 【選任した代理人】 【識別番号】 100088328 【弁理士】 金田 暢之 【氏名又は名称】 【選任した代理人】 【識別番号】 100106297 【弁理士】 伊藤 克博 【氏名又は名称】 【選任した代理人】 【識別番号】 100106138 【弁理士】 石橋 政幸 【氏名又は名称】 【手数料の表示】 【予納台帳番号】 201087 21,000円 【納付金額】 【提出物件の目録】 特許請求の範囲 1 【物件名】 明細書 1 【物件名】 要約書 1 【物件名】

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

検体中に含まれるHLA-DQ型のアリルの同定に利用し得る多数のプローブからなる プローブセットであって、

前記多数のプローブのそれぞれが、明細書中のアリルリスト中の各アリルの配列中の大 文字で表記された塩基を含む部分配列を有する ことを特徴とするプローブセット。

【請求項2】

明細書中の表1Aおよび表1B-1~表1B-2に記載されるプローブ群または表2A および表2B-1~表2B-2に記載されるプローブ群からなる請求項1に記載のプロー ブセット。

【請求項3】

検体からの試料中に含まれるHLA-DQ型のアリルをプローブセットを用いて同定す る方法であって、

該プローブセットが請求項1または2に記載のプローブセットであることを特徴とする HLA-DQ型のアリルを同定する方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】HLA-DQアレルを同定するためのプローブセット及び特定方法 【技術分野】

[0001]

本発明は、人のHLA-DQアレルを同定するためのプローブセット及び特定方法に関 する。

【背景技術】

[0002]

人白血球のHLA-DQ型の各アレルについては、従来から血清学的レベルのタイピン グが行われてきた。この場合、特別なサンプル処理を必要とせず、抗原抗体反応で容易に タイピングが可能である反面、同定できる内容はアミノ酸配列の違いを区別できるレベル を4桁以上の数字での命名法における3、4桁目とした場合、最初の2桁の数字が血清学 的レベルのタイピングで同定可能なレベルである(日本組織適合性学会HLA標準化委員 会「アリル表記法と結果報告の原則について2000」http://jshi.umin.ac.jp/standar ization/hyoki.html参照)。

[0003]

その他のゲノム抽出を伴うタイプの市販キットの多くは、各アレルを個別に同定可能な 精度のものではなく、複数のアリルをセットとして区別しているのが現状である。また最 も詳細な多型解析を可能とするSBT (Sequencing Based Typing) 法に基づくキットにし ても、たいていのサンプルはヘテロ接合体であるため、ambiguityの問題を一度に解決で きず、再検査を必要とすることが多い。こうした問題を伴うアレルは、IHWG学会のhttp:/ /www.ihwg.org/protocols/sbt/ambiguities2.pdfにまとめて紹介されている。

【非特許文献1】(日本組織適合性学会HLA標準化委員会「アリル表記法と結果報 告の原則について2000」(http://jshi.umin.ac.jp/standarization/hyoki.html

【非特許文献 2】 http://www.ihwg.org/protocols/sbt/ambiguities2.pdf

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

[0004]

一方、近年は高度医療の発達に伴い、臓器移植などの際に詳細なタイピングが要求され るほか、糖尿病や癌、その他多因子病においても、薬剤投与との関連が示唆され、医療行 為に対するエヴィデンスが求められている。こうした背景から、各アリルを個別に同定可 能な試験方法が望まれており、本発明はかかる要望に対してHLA-DQの各アリルを個 別に同定するために有用であるプローブセット及びそれを用いたHLA-DQのアリルの 同定方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

[0005]

本発明にかかるHLA-DQアリルを同定するためのプローブセットは、検体中に含ま れるHLA-DQ型のアリルの同定に利用し得る多数のプローブからなるプローブセット であって、前記多数のプローブのそれぞれが、明細書中のアリルリスト中の各アリルの配 列中の大文字で表記された塩基を含む部分配列を有することを特徴とするプローブセット である。

[0006]

また、本発明にかかるHLA-DQアリルの同定方法は、検体からの試料中に含まれる HLA-DQ型のアリルをプローブセットを用いて同定する方法であって、該プローブセ ットが請求項1または2に記載のプローブセットであることを特徴とするHLA-DQ型 のアリルを同定する方法である。

【発明の効果】

[0007]

本発明にかかるプローブセット及びそれを用いたHLA-DQアレルの同定によって、

臓器移植、癌、糖尿病、その他多因子病において必要とされる体質判定、テーラーメイド 医療に貢献することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

[0008]

本発明のプローブセットを構成する各プローブは後述するアレルリストの各アレルにお ける大文字表記の塩基を含む部分配列をそれぞれが有するものである。好ましくは、大文 字の塩基を含む10~30の塩基からなる部分を選択し得られた部分塩基配列からなるプ ローブを用いてプローブセットを構成する。具体例としては、後述の表1Aおよび表1B $-1 \sim 1$ B -2 のプローブリスト 1 、または表 2 A および表 2 B $-1 \sim 2$ B -2 のプロー ブリスト2に挙げられた各プローブ群からプローブセットを構成することができる。例え ば、プローブリスト1における0番のプローブは、DQA1*010101の最初の大文字(G)が 含まれている部分「tgaatttgatggagatgagG」の20塩基配列からなるものであり、プロー ブリスト2におけるプローブ0番もまた同じアリルの最初の大文字のGを含む部分「ggag atgagGagttctacg」の19塩基配列からなるものである。

[0009]

なお、後述のアリルリストにおける「DQA1*」で示されている番号は、各アリルに 付された固有の番号であり、日本組織適合性学会HLA標準化委員会による「アリル表記 法一に従ったものである。

[0010]

本発明にかかるアリルの同定方法におけるプローブによるアリルの検出には、例えば、 2つの方法が可能である。一つはハイブリダイゼーション法によって検出する場合と、も う一つはPCR法によってハイブリダイゼーションをすることなしに直接検出する場合で ある。いずれの場合も、好ましくは十数個から二十数個程度の長さのオリゴヌクレオチド に、大文字で表した塩基を含むようにプローブが設計される。

$[0\ 0\ 1\ 1]$

また、本発明において提供されるプローブアレイは、各アリルを個別に同定するための 変異塩基の組をプローブとして選択する位置で提示しているともいえる。この変異塩基を 検出するための方法にもハイブリダイゼーション法による検出方法と、PCR法によって ハイブリダイゼーションをすることなしに直接検出する方法が好適に利用できる。これら の場合にも、好ましくは十数個から二十数個程度の長さのオリゴヌクレオチドに、大文字 で表した塩基を含むようにプローブが設計される。

$[0\ 0\ 1\ 2]$

ハイブリダイゼーションによって変異を検出する場合は、プローブの中心付近にミスマ ッチが(即ち大文字で表した変異塩基が)来るようにプローブを設計したほうが、フルマ ッチとミスマッチの配列間でTmに差がつきやすく、ハイブリダイゼーションの反応温度 を調節することによって、両者を分離しやすい。

[0013]

一方PCR法によって直接変異を検出する場合は、酵素がアニールした二本鎖を認識して 伸長しないよう、むしろ3'末端側にミスマッチを配置することが行われる。またAllel Spcific Primerのように、3'末端から2つ目にミスマッチを配置し、3個目に人為的にミ スマッチを追加したり(東洋紡(株))、3'末端側にミスマッチを配置するがライゲー ションによって、プローブの環状化を行う方法(アマシャムバイオサイエンス(株))、 TaqMan-MGB法 (ABI社) LNAを使った3'末端ミスマッチ(プロリゴ・ジャパン(株))な ど、いくつかのバリエーションが可能である。

【実施例】

[0014]

以下実施例により本発明を更に説明する。

[0015]

(実施例1)

アマシャムバイオサイエンスのGFX Genomic Blood DNA Purification Kitを使って、人

の血液1mlからDNAの抽出を行った。以下にプロトコールを示す。 血液1ml

↓ +RBC Lysis Solution (溶血)

↓+血液サンプル (穏やかに混和)

↓室温、5分間

↓12,000~16,000×g、20秒間遠心

↓上清を20~50 μl残して捨てる

↓沈殿物を再懸濁

↓ +Extraction Solution (激しくボルテックス)

↓室温、5分間 (DNAの抽出)

↓Collection TubeにGFX Columnをセット

↓溶出バッファーを70℃に加温

↓+サンプル

↓5,000×g、1分間遠心(DNAの結合)

↓ +Extraction Solution (洗浄)

↓5,000×g、1分間遠心

↓ + Wash Solution (洗浄)

↓12,000×g、3分間遠心

↓GFX Columnを遠心チューブにセット

↓+純水で溶出

↓室温、1分間

↓5,000~8,000×g、1分間遠心

230 μ 1 に 濃縮調整 ……溶液 (1)

次にキアゲン社のQuantiTect SYBR Green PCR Kit、ABI社のGeneAmp5700を使って、定量PCRを行った。反応組成およびプロトコールを以下に示す。

[0016]

1) 反応組成/well (96wellマイクロプレート)

QuantiTect SYBR Green 2×プレミクス:10μ1

溶液(1):1μ1

プローブリスト 1 A および 1 B の各プローブ $(10 \text{ pmol}/\mu \text{ } 1):1\mu \text{ } 1$

ミックスプライマ(10 pmol/μ 1)注) :4μ l

超純水:4μ1

(合計:20 µ 1)

注) 以下の配列を持つ各10 pmol/μ 1 の水溶液各 1 μ 1

GGTGAGGTAACTGATCTTG

TCCTTCTGGCTGTTCCAGTACTC

2) PCRプログラム

94 C: 180 secの後に(94 C: 10 sec+66 C: 10 sec+72 C: 20 sec)の30 cyclesを行った。5700 ソフトウエア画面上のAmp PlotおよびDissociationカーブおよびアレループローブ対応リスト1(表 3 A および表 3 B -1 ~表 3 B -2)を参照して、DQA1*0103とDQB1*060101であると同定された。

[0017]

(実施例2)

人の血液1mlからのDNA抽出は、実施例1と同様に行った。次にタカラバイオ(株)のExTaq、ABI社のPCR装置9700を使って、人HLA-DQのPCRを行った。反応組成およびプロトコールを以下に示す。

[0018]

1) 反応組成/tube

溶液(1):3μ1

 $C_{V}-3 \text{ dUTP } (1\text{mM}) : 2 \mu 1$

ミックスプライマ(10 pmol/μ 1)注):6μ l

超純水:9µ1

(合計::40μ1)

注)以下の配列を持つ各10 pmol/μ l の水溶液各 l μ l

GGTGAGGTAACTGATCTTG ATGATCCTAAACAAAGCTCTG

TGTGCTACTTCACCAACGGGACG

2) PCRプログラム

94℃:180secの後に、(94℃:10sec+66℃:10sec+72℃ 20sec)の30cyclesを行っ た。反応終了後、精製用カラム(QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit)を用いて未 反応のdNTPs等のClean Upを行った。

[0019]

一方上述の検体に対して、アレルを同定するためのDNAマイクロアレイを作製した。作 製の方法は、特開平11-187900号公報の実施例に従った。固相化のための官能基はSH基と し、ガラス基板上にシランカップリング処理を行い、2価性試薬のEMCS(N-(6-Maleimidoc aproyloxy) succinimide) 介してSH基と架橋した。各ドットのプローブは、プローブリス ト2の各プローブを用いた。

[0020]

次に先ほどの検体と作製したDNAマイクロアレイを用いて、ハイブリダイゼーションを 行った。DNAマイクロアレイは予めBSA(牛血清アルブミン)1wt%加PBSで2時間ブロッキ ングした。検体はその塩濃度がPBSと等しくなるように、また0.1wt%SDS(ドデシル硫酸 ナトリウム)、25% Form amideとなるように調整し、その $50\,\mu$ 1 を、先ほどのブロッキン グ済みDNAマイクロアレイと60℃で2時間反応させ、未反応物を2×SSC溶液(NaC1 300m M 、Sodium Citrate (trisodium citrate dihyDQate, C6H5Na3·2H20) 30mM、p.H. 7.0) で3回、続いて0.1×SSC溶液で2回洗浄した後風乾させ、Axon社製、GenePix 4000Bを用い で蛍光測定を行った。アレループローブ対応リスト2 (表4 Aおよび表4 B-1~4 B-2) を参照してDQA1*0103とDQB1*060101であることが同定された。

[0021]

アレルリスト

atgatcctaaacaaagctctgctgctgggggccctcgctctgaccaccgtgatgagcccctgtggDQA1*010101 aggtgaagacattgtggctgaccacgttgcctcttgtggtgtaaacttgtaccagttttacggtccctctggccagtacacccat gaattt gat ggag at gag Gag ttctac gt ggacct ggag ag gag ag gag ag gag at gcct gg gt ggcct gag ttcag comments and the same of the s $\verb|ctacaactctaccgctgctaccaatgaggttcctgaggtcacagtgttttccaagtctcccgtgacactgggtcagccca| \\$ gaaggtgtttctgagaccagcttcctctccaagagtgatcattccttcttcaagatcagttacctcaccttcctccttctgctgatgagatttatgactgcaaggtggagcactggggcctggaccagcctcttctgaaacactgggagcctgagattctup and the contract of the $act \verb|gtcttcatcatccaaggcctgcgttcagttggtgcttccagacaccaagggccattgtga|$

atgatcctaaacaaagctctgctgctgggggccctcgctctgaccaccgtgatgagcccctgtggDQA1*010102 aggtgaagacattgtggctgaccacgttgcctcttgtggtgtaaacttgtaccagttttacggtccctctggccagtacacccat gaat tt gat ggag at gag gag tt ctac gt ggac ct ggag ag gag gag gag act gcct gg gt ggcct gag tt cag can be supported by the support of the supported by the support of the support $\verb|ctacaactctaccgctgctaccaatgaggttcctgaggtcacagtgttttccaagtctcccgtgacactgggtcagccca| \\$ a caccet cattigt cttgtggacaa catcitte ctcctgtggtcaa catcacatggctgagcaatgggcagtcagtcacagaaggtgtttctgagaccagcttcctctccaagagtgatcattccttcttcaagatcagttacctcaccttcctccttctgctgatgagatttatgactgcaaggtggagcactggggcctggaccagcctcttctgaaacactgggagcctgagattc $act \verb|gtcttcatcatccaaggcctgcgttcagttggtgcttccagacaccaGgggccattgtga|$

DQA1*0105 atgatcctaaacaaagctctgctgctgggggccctcgctctgaccaccatgatgagcccctgtgg aggtgaagGcattgtggctgaccacgttgcctcttgtggtgtaaacttgtaccagttttacggtccctctggccagtaca

6/

DQA1*0106 ctgaccacgttgcctcttgtggtgtaaacttgtaccagttttacggtcctcttggccagtacacc catgaatttgatggagatgagcagttctacgtggacctggagaggaggaggGctgcctggcggtggcctgagttcagcaa atttggaggttttgacccgcagggtgcactgagaaacatggctgtggcaaaacacaacttgaacatcatgattaaacgct acaactctaccgctgctaccaatg

DQA1*0303 atgatectaaacaaagetetgatgetgggggeeetegeetgaceaeegtgatgageeettgtgg aggtgaagacattgtggetgaceatgttgeetettaeggtgtaaaettgtaeeagtettatggteeetettgggeagtaea geeatgaatttgatggagaeggaggttetatgtggacetggagaggaaggaaggagagaetgtetggeagttgeetetgteege agatttagaagatttgaeegeaatttgeaetgaeaaaeategetgtgetaaaaeataaettgaaeateggtataaaeg etecaaetetaeegetgetaeeaatgaggteetgaggteaeagtttteeaagteteeegtgaeaetgggteaeea acaeeeteaeetgetgtggaeaaeatettteeteetgtggteaaeateaeetggetgageaatgggeaeteagtaea gaaggtgtteetgagaeeagetteeteeaagagtgateatteettetteaagateagttaeeteaeetteeteette tgAtgatgagatttatgaetgeaaggtgagaeetggggeeetggageetgagaeetteeteetgagate

caacacct at gt cag a gct cacaga gact gt gg tct gcgccct gg gg tt gt ct gt gg gcct cgt gg gcatt gt gg gg acc gt tt gat cat ccg ag gcct gcg tt cag tt gg tg tt cca gac accaa gg gccct tg tg a

DQA1*050101 atgatectaaacaaagetetgatgetgggggeeettgeeetgaceacegtgatgageeeettgg aggtgaagacattgtggetgaceacgtegeetettatggtgtaaacttgtaceagtettacggteeetetggeeagtaca eccatgaatttgatggagatgageagttetacgtggacetggggaggaaggaggaggaggatgtetggtgtttgeetgtteteaga eaatttaga...tttgaceegeaatttgeactgacaaacategetgteetaaaacataacttgaacagtetgattaaacg etceaaetetaeegetgetaeeaatgaggteetgaggteacagtgttteeaagteteeegtgaeactgggteageea acateeteatetgtettgtggacaacatettteeteetgtggteaacateacatggetgageaatgggeaeteageaa gaaggtgtttetgagaceagetteeteeteeaaggtgateatteettetteaagateagttaeeteaceeteeteette tgetgaggaggaggtatgaeaggtgaggeetgggeetggaeAageetettetgaaacaetgggageetgagatte eageeeetatgteagageetgggeetgggeetgggAttgtetgtgggeetegggaettgtgggeaetggtgggeaetggtgggeetgggaettgtgggeetegggaettgtgggeetegggeattgtgggeeteggeettgtgg

DQA1*0504 ctgaccacgtcgcctcttatggtgtaaacttgtaccagtcttacggtcTctctggccagtacacc catgaatttgatggagatgagcagttctacgtggacctggggaggaggaggaggaggatgtctggtgtttgcctgttctcagaca atttaga...tttgacccgcaatttgcactgacaaacatcgctgtcctaaaacataacttgaacagtctgattaaacgct ccaactctaccgctgctaccaatg

8/

DQA1*060102 ggtgtaaacttgtaccagtcttacggtccctctggccagttcacccatgaatttgatggagacga gcagttctacgtggacctggggaggaaggaaggatgtctggtgtttgcctgttctcagacaatttaga...tttgacccgc aatttgcactgacaaacatcgcCgtgacaaaacacaacttgaacatcctgattaaacgctccaactctaccgctgctacc aatga

DQB1*050101 gggcctgtgctacttcaccaacgggacggagcgctgtgcggggtgtgaccagacacatctataacc gagaggagtacgtgcgcttcgacagcgacgtgggggtgtaccgggcAgtgacgccgcaggggcggcctgTtgccgagtac tggaacagccagaaggaagtcctggagggggcccgggcgTcggtggacaGggtgtgcagacacaactacgaggtggcgta ccgcgggatcctgcagaggagagtggagcccacagtgaccatctccccatccaggacagaggccctcaaccaccacacac tgctgatctgctcggtgacagatttctatccaagccagatcaaagtccggtggtttcggaatgatcaggaggagacagcc ggcgttgtgccaccccctcattaggaacggtgactggaccttccagatcctggtgatgctggaaatgaccccagcg tggagatgtctacacctgccacgtggagcaccccagcctccagagccccatcaccgtggagtgg

DQB1*050102 gggcctgtgctacttcaccaacgggacggagcgctgtgcggggtgtgaccagacacatctataacc gagaggagtacgtgcgcttcgacagcgacgtgggggtgtaccgggcggtgacgccgaggggggcctgttgccgagtac tggaacagccagaaggaagtcctggagggggcccgggcgtcggtggacagAgtgtgcagacacaactacgaggtggcgta ccgcgggatcctgcagagg

DQB1*050202 gggcctgtgctacttcaccaacgggacggagcgcgtgcggggtgtgaccagacacatctataaccgagaggagtacgtgcgcttcgacagcgacgtgggggtgtaTcgggcggtgacgccgcagggggggcctaGCgccgagtactggaacagccagaaggaagtcctggaggggcccgggcgtcggtggacagAgtgtgcagacacaactacgaggtggcgtaccgcggggatcctgcagaga

DQB1*050301 gggcctgtgctacttcaccaacgggacggagcgctgtgcggggtgtgaccagacacatctataacc gagaggagtacgtgcgcttcgacagcgacgtgggggtgtatcgggcggtgacgccgcagggggggcctgACgccgagtac tggaacagccagaaggaagtcctggagggggcccgggcgtcggtggacagAgtgtgcagacacaactacgaggtggcgta

9/

ccgcgggatcctgcagaggagagtggagcccacagtgaccatctccccatccaggacagaggccctcaaccaccaccaccacctgctgatctgctcggtgacagatttctatccaagccagatcaaagtccggtggtttcggaatgatcaggaggagacagccggcgttgtgtccacccccctcattaggaacggtgactggaccttccagatcctggtgatgctggaaatgactcccagcgtggagatgtctacacctgccacgtggagcaccccagcctccagagccccatcaccgtggagtgg

DQB1*050302 gacggagcgctgcggggtgtgaccagacacatctataaccgagaggagtacgtgcgcttcgaca gcgacgtgggggtgtaTcgggcggtgacgccgcaggggcggcctgAtgccgagtactggaacagccagaaggaagtcctg gag

DQB1*0504 gggcctgtgctacttcaccaacgggacggagcgctgcggggtgtgaccagatacatctataacc gagaagagtacgtgcgcttcgacagcgacgtgggggtgtaccgggcggtgacgccgcaggggggcctaGcgccgagtac tggaacagccagaaggacatcctggaggAggaccgggcgtcggtggacagggtgtgcagacacaact

 ccg cac gac ctt g cag cgg cgag tgg ag ccca cag tgac cat ctccc cat ccag gac ag ag gccct caa cca cac accae can be a considered for the constant of the constanggcgttgtgtccacccccttattaggaacggtgactggaccttccagatcctggtgatgctggaaatgactcccagcgtggagacgtctacacctgccacgtggagcaccccagcctccagaaccccatcaTcgtggagtgg

ggg cat gt gct a ctt cac caa cgg gac gg gg cgt gcgt cTt gt gac cag at a cat ctata a cccc a cccc a ctata a ccc a ctata aDQB1*030303

ccgcacgaccttgcagcggcgag

DQB1*0304 tggaacagccagaaggaagtcctggagaggacccgggggggttggacacggtgtgcagacacaactaccagttggagctccg cac gac ctt g cag cgg cgag tgg ag ccca cag tgac cat ctccccat ccag gac ag ag gccct caa ccac accac accactgctggtctgctcagtgacagatttctatccagcccagatcaaagtccggtggtttcggaatgaccaggaggagacaaccggcgttgtgtccacccccttattaggaacggtgactggaccttccagatcctggtgatgctggaaatgactcccagcatggagaCgtctacacctgccacgtggagcaccccagcctccagaAccccatcaccgtggagtgg

 $\tt gggcatgtgctacttcaccaacgggacCgagcgcgtgtggggtgtgaccagatacatctataacc$ ccg cac gac ctt g cag cgg cgag tgg ag ccca cag tgac cat ctccc cat ccag gac ag ag g ccct caac cac cac accae can be a compared to the compared transfer of the compared tratgctggtctgctcagtgacagatttctatccagcccagatcaaagtccggtggtttcggaatgaccaggaggagacaactggcgttgtgtccacccccttattaggaacggtgactggaccttccagatcctggtgatgctggaaatgactcccagcgtggagacgtctacacctgccacgtggagcaccccagcctccagaaccccatcatcgtggagtgg

gggcatgtgctacttcaccaacgggacggagcgcgtgcggggtgtgaccagatacatctataaccDQB1*030502 ccgcacgaccttgcagcggcgag

DQB1*0306 ccgcacgaccttgcagcggcgag

DQB1*0307 ccgcacgaccttgcagcggcga

ggg catgtg ctacttcacca acgggacg gagcgcgtgcgtcttgtgaccagatacatctata accDQB1*0308 tggaacagccagaaggaagtcctggaggggacccggggggttggacaCggtgtgcagacacaactaccagttggagctccgcacgaccttgcagcggcgag

DQB1*0309 tgctggtctgctcagtgacagatttctatccagcccagatcaaagtccggtggtttcggaatgaccaggaggagacaaccggcgttgtgtccacccccttattaggaacggtgactggaccttccagatcctggtgatgctggaaatgactccccagca $tgc \\ C\dots gtc \\ tacacct gccacgt ggag \\ caccccag \\ cct \\ ccag \\ aaccccat \\ caccgt ggag \\ tgg$

DQB1*0310 tgctggtctgctcagtgacagatttctatccagcccagatcaaagtccggtggtttcggaatgaccaggaggagacaaccggcgttgtgtccaccccccttattaggaacggtgactggaccttccagatcctggtgatgctggaaatgactcccagcAtggagaCgtctacacctgccacgtggagcaccccagcctccagaAccccatcaccgtggagtgg

DQB1*0401 gggcatgtgctacttcaccaacgggaccgagcTcgtgcggggtgtgaccagatacatctataaccggagggggtgtacgcgcgcttcgacagcgacgtgggggtgtatcgggcggtgacgccgcttggggcggcttgacgccgagtactggaatagccagaaggacatcctggaggaggaccggggtggacaccgtatgcagacacaactaccagttggagctcgcacgaccttgcagcggcgagtggagcccacagtgaccatctcccatccaggacagaggccctcaaccacacacctgctggtctgctcagtgacagatttctatccagcccagatcaaagtccggtggtttcggaatgaccaggaggagacaactggcgttgtgtccacccccttattaggaacggtgactggaccttccagatcctggtgatgctggaaatgactcccagcgtgagagacgtctacacctgcacgtgagacaccccagcctccagaaccccatcatcgtggagtgg

DQB1*060102 gccatgtgctacttcaccaacgggacggagcgcgtgcgttatgtgaccagatacatctataaccg agaggaggacgtgcgcttcgacagcgacgtggggtgtatcgggcggtgacCccgcaggggcggcctgacgccgagtact ggaacagccagaaggacatcctggagaggacccgagcggagttggacacggtgtgcaga

 tgctggtctgctcggtgacagatttctatccaggccagatcaaagtccggtggtttcggaatgatcaggaggagacagccggttgtgtccaccccccttattaggaatggtgactggacTttccagatcctggtgatgctggaaatgactcccagcgtggagatgtctacacctgccacgtggagcaccccagcctccagagccccatcaccgtggagtgg

DQB1*060502 ggacggagcgcgtgcgtcttgtAaccagatacatctataaccgagaggagtacgcgcgcttcgacagcgacgtgggggtgtaccggggggtgacgccgcagggggggcggcctgtCgccgagtactggaacagccagaaggaagtcctggagAggAcccgggcggagttggacaCg

DQB1*0609 gggcatgtgctacttcaccaacgggacggagcgctgtgctcttgtaaccagaTacatctataacc gagaggagtacgcgcgttcgacagcgacgtgggggtgtaccgggcggtgacgccgcagggggcggcctgttgccgagtac tggaacagccagaaggaagtcctggagAggacccggggggggttggacacggtgtgcagacacaactacgaggtgggta ccgcgggatcctgcagaggagagtggagccacagtgaccatctccccatccaggacagaggccctcaaccaccacacc tgctggtctgctcggtgacagatttctatccaggccagatcaaagtccAgtggtttcggaatgatcaggaggagacacc ggcgttgtgccacccccttattaggaatggtgactggactttccagatcctggtgatgctggaaatgaccccagcg tggagatgtctacacctgccacgtggagcaccccagcctccagagccccatcaccgtggagtgg

[0022]

以下、表1 A および表1 B - 1 \sim 1 B - 2 にプローブリスト1 を、表2 A および表2 B - 1 \sim 2 B - 2 にプローブリスト2 を示す。

【0023】 【表1】

表1A

プローブ番号	塩基配列	
0		(配列番号:1)
ĭ	ggt gct tcc aga cac caG	(配列番号:2)
2	gg ttg tct gtg ggc ctc A	(配列番号:3)
3	cag ccc aac acc ctc atC	(配列番号:4)
4	g ctg agc aat ggg cac G	(配列番号:5)
5	ca gag act gtg gtc tgc A	(配列番号:6)
6	c cct tgt gga ggt gaa gG	(配列番号:7)
7	cct gtg gtc aac atc acC	(配列番号:8)
8	ccc tgt gga ggt gaa gG	(配列番号:9)
9	c ctg gag agg aag gag G	(配列番号:10)
10	tg cct ctg ttc cac aga C	(配列番号:11)
11	x ag cct gag att cca A	(配列番号:12)
12	gcc ctg acc acc gtg aC	(配列番号:13)
13	c acc ttc ctc cct tct gA	(配列番号:14)
14	tt aaa cgc tcc aac tct acT	(配列番号:15)
15	cc aga cac caa ggg ccC	(配列番号:16)
16	ca gtg ttt tcc aag tct ccT	(配列番号:17)
17	g cac tgg ggc ctg gac A	(配列番号:18)
18	g gtc tgc gcc ctg ggA	(配列番号:19)
19	ct gac cac gtt gcc tct tA	(配列番号:20)
20	c cta aaa cat aac ttg aac agT	(配列番号:21)
21	c aga caa ttt aga ttt gac cG	(配列番号:22)
22	tc acc ctc ctc cct tct T	(配列番号:23)
23	tg tac cag tct tac ggt cT	(配列番号:24)
24	ag gtg gag cac tgg ggA	(配列番号:25)
25	ggt ccc tct ggc cag tT	(配列番号:26)
26	cc aag tot ccc gtg acG	(配列番号:27)
27	gca ctg aca aac atc gcC	(配列番号:28)

[0024]

【表2】

表18-1

プローブ番号	塩基配列	
	g ggg gtg tac cgg gcA	(配列番号:29)
1	cg cag ggg cgg cct gT	(配列番号:30)
2	ag ggg gcc cgg gcg T	(配列番号:31)
3	gg gcg tcg gtg gac aG	(配列番号:32)
4	gg gcg tcg gtg gac agA	(配列番号:33)
5	ca gat ttc tat cca agc caC	(配列番号:34)
6	gc gac gtg ggg gtg taT	(配列番号:35)
7	cg cag ggg cgg cct aG	(配列番号:36)
8	g cag ggg cgg cct agC	(配列番号:37)
9	cg cag ggg cgg cct gA	(配列番号:38)
10	g cag ggg cgg cct gaC	(配列番号:39)
11	g aag gac atc ctg gag gA	(配列番号:40)
12	g gac atc ctg gag agg aaA	(配列番号:41)
13	ct ccc cag cgt gga gaC	(配列番号:42)
14	c cgg tgg ttt cgg aat gG	(配列番号:43)
15	ctg ctg ggg ctg cct gA	(配列番号:44)
16	c ttc gac agc gac gtg gA	(配列番号:45)
17	cg ctg ggg ccg cct gA	(配列番号:46)
18	ct ccc cag cat gga gaC	(配列番号:47)
19	cac ccc agc ctc cag aA	(配列番号:48)
20	aac cga gag gag tac gcA	(配列番号:49)
21	g ctg ggg ccg cct gC	(配列番号:50)
22	agg acc cgg gcg gag T	(配列番号:51)
23	c ctc cag aac ccc atc aT	(配列番号:52)
24	cg gag cgc gtg cgt cl	(配列番号:53)
25	g acg ccg ctg ggg cC	(配列番号:54)
26	cag aag gaa gtc ctg gag A	(配列番号:55)
27	tac ttc acc aac ggg acC	(配列番号:56)
		

[0025]

【表3】

表1B-2

プローブ番号	塩基配列	
28	cgg gcg gag ttg gac aC	(配列番号:57)
29	cg tcg gtg gac acc gtA	(配列番号:58)
30	gtg ggg gtg tat cgg gT	(配列番号:59)
31	tg act ccc cag cat gcC	(配列番号:60)
32	g gaa atg act ccc cag cA	(配列番号:61)
33	gg aac agc cag aag gaa gA	(配列番号:62)
34	acc aac ggg acc gag cT	(配列番号:63)
35	g ccg ctg ggg cgg cT	(配列番号:64)
36	cc atg tgc tac ttc acc aaT	(配列番号:65)
37	tg tat cgg gcg gtg acC	(配列番号:66)
38	g ttt cgg aat gac cag gaA	(配列番号:67)
39	gtg cgt ctt gtg acc aga T	(配列番号:68)
40	g gcg ttc cgc ggg atc T	(配列番号:69)
41	t agg aat ggt gac tgg acT	(配列番号:70)
42	gag cgc gtg cgt ctt gtA	(配列番号:71)
43	ca ggc cag atc aaa gtc cA	(配列番号:72)
44	c gtg ggg gtg tac cgC	(配列番号:73)
45	ag gaa gtc ctg gag agg A	(配列番号:74)
46	a cac aac tac gag gtg gG	(配列番号:75)
47	gtg cgt ctt gta acc aga T	(配列番号:76)
48	g cag ggg cgg cct gtC	(配列番号:77)
49	c aac tac gag gtg gcg tT	(配列番号:78)
50	g cgg cct gat gcc gag A	(配列番号:79)
51	gg gcg gtg acg ccg cT	(配列番号:80)
52	cg ctg ggg cgg cct gA	(配列番号:81)
53	ggg acc cgg gcg gag T	(配列番号:82)
33	353	

[0026]

【表4】

表 2 A

プローブ番号	塩基配列	
0	gga gat gag Gag ttc tac g	(配列番号:83)
1	c aga cac caG ggg cca tt	(配列番号:84)
2	gtg ggc ctc Atg ggc att	(配列番号:85)
3	c acc ctc atC tgt ctt gtg	(配列番号:86)
4	aat ggg cac Gca gtc aca	(配列番号:87)
5	g gtc tgc Acc ctg ggg	(配列番号:88)
6	ga ggt gaa gGc att gtg g	(配列番号:89)
7	c aac atc acC tgg ctg ag	(配列番号:90)
8	gg aag gag Gct gcc tgg	(配列番号:91)
9	ctg ttc cac aga Ctt aga c c ttt	(配列番号:92)
10	gag att cca Aca cct atg tc	(配列番号:93)
11	c acc gtg aCg agc cct t	(配列番号:94)
12	ctc cct tct gAt gat gag at	(配列番号:95)
13	c aac tct acT gct gct acc	(配列番号:96)
14	c atc atc cGa ggc ctg c	(配列番号:97)
15	c aag tct ccT gtg acg ct	(配列番号:98)
16	ggc ctg gac Aag cct ctt	(配列番号:99)
17	c gcc ctg ggA ttg tct gt	(配列番号:100)
18	gtt gcc tct tAt ggt gta aa	(配列番号:101)
19	aac ttg aac agT ctg att aaa c	(配列番号:102)
20	a cg ttt gac cGg caa ttt gca c	(配列番号:103)
21	ctc cct tct Tct gag gag	(配列番号:104)
22	ct tac ggt cTc tct ggc c	(配列番号:105)
23	g cac tgg ggA ctg gac aa	(配列番号:106)
24	ct ggc cag tTc acc cat g	(配列番号:107)
25	ccc ata acG ctg ggt c	(配列番号: 108)
26	ca aac atc gcC gtg aca aaa	(配列番号:109)

[0027]

【表5】

表2B-1

プローブ番号	塩基配列	
0		(配列番号:110)
ĭ	g cgg cct gTt gcc gag	(配列番号:111)
2	c cgg gcg Tcg gtg gac	(配列番号:112)
3	g gtg gac aGg gtg tgc a	(配列番号:113)
4	g gtg gac agA gtg tgc ag	(配列番号:114)
5	t cca age caC ate aaa gte	(配列番号:115)
6	ggg gtg taT cgg gcg g	(配列番号:116)
7	g cgg cct aGc gcc gag	(配列番号:117)
8	cgg cct agC gcc gag t	(配列番号:118)
9	g cgg cct gAc gcc gag	(配列番号:119)
10	cgg cct gaC gcc gag t	(配列番号:120)
11	g cgg cct gAt gcc gag	(配列番号:121)
12	c ctg gag gAg gac cgg	(配列番号:122)
13	gag agg aaA cgg gcg gc	(配列番号:123)
14	g cgt gga gaC gtc tac ac	(配列番号:124)
15	t cgg aat gGc cag gag g	(配列番号:125)
16	g ctg cct gAc gcc gag	(配列番号:126)
17	c gac gtg gAg gtg tac c	(配列番号:127)
18	g ccg cct gAc gcc gag	(配列番号:128)
19	g cat gga gaC gtc tac ac	(配列番号:129)
20	gc ctc cag aAc ccc atc a	(配列番号:130)
21	g gag tac gcA cgc ttc ga	(配列番号:131)
22	ccg cct gCc gcc gag	(配列番号:132)
23	gg gcg gag Ttg gac acg	(配列番号:133)
24	ac ccc atc aTc gtg gag t	(配列番号:134)
25	gc gtg cgt cTt gtg acc a	(配列番号:135)
26	g ctg ggg cCg cct gac	(配列番号:136)
27	c ctg gag Agg acc cgg	(配列番号:137)
_		

[0028]

【表6】

表 2 B - 2

塩基配列	
aac ggg acC gag cgc g	(配列番号:138)
	(配列番号:139)
	(配列番号:140)
	(配列番号:141)
cc cag cat gcC g t gtc tac	(配列番号:142)
	(配列番号:143)
	(配列番号:144)
g acc gag cTc gtg cgg	(配列番号:145)
g ggg cgg cTt gac gcc	(配列番号:146)
	(配列番号:147)
gcg gtg acC ccg cag g	(配列番号:148)
	(配列番号:149)
t gtg acc aga Tac atc tat aa	(配列番号:150)
gc ggg atc Ttg cag agg	(配列番号:151)
t gac tgg acT ttc cag atc	(配列番号:152)
g cgt ctt gtA acc aga cac	(配列番号:153)
tc aaa gtc cAg tgg ttt cg	(配列番号:154)
gtg tac cgC gcg gtg ac	(配列番号:155)
g gag agg Acc cgg gcg	(配列番号:156)
c gag gtg gGg tac cgc	(配列番号:157)
g cgt ctt gtA acc aga tac	(配列番号:158)
t gta acc aga Tac atc tat aac	(配列番号:159)
cgg cct gtC gcc gag t	(配列番号:160)
c cgg gcg gAg ttg gac	(配列番号:161)
g gtg gcg tTc cgc ggg	(配列番号: 162)
gat gcc gag Aac tgg aac	(配列番号:163)
acg ccg cTg ggg cgg	(配列番号:164)
	aac ggg acC gag cgc g ag ttg gac aCg gtg tgc a g gac acc gtA tgc aga ca g tat cgg gTg gtg acg c cc cag cat gcC g t gtc tac t ccc cag cAt gga gac g ag aag gaa gAc ctg gag ag g acc gag cTc gtg cgg g ggg cgg cTt gac gcc c ttc acc aaT ggg acg ga gcg gtg acC ccg cag g t gac cag gaA gag aca gc t gtg acc aga Tac atc tat aa gc ggg atc Ttg cag agg t gac tgg acT ttc cag atc g cgt ctt gtA acc aga cac tc aaa gtc cAg tgg ttt cg gtg tac cgC gcg gtg ac g gag agg Acc cgg gcg c gag gtg gGg tac cgc g cgt ctt gtA acc aga tac t gta acc aga Tac atc tat aac cgg cct gtC gcc gag t c cgg gcg gAg ttg gac g gtg gcg tTc cgc ggg gat gcc gag Aac tgg aac

[0029]

【表7】

[0030]

表3A

고니비포므	烩出田(のプロー	ブ番号
アリル番号		,, , .	/ н Ј
DQA1*010101	0		
DQA1*010102	1		
DQA1*010201	2		
DQA1*010202	3	2	
DQA1*0103	4		
DQA1*010401	5		
DQA1*010402	6	7	
DQA1*0105	8		
DQA1*0106	9		
DQA1*0201	10		
DQA1*030101	11		
DQA1*0302	12		
DQA1*0303	13		
DQA1*040101	14	15	
DQA1*040102	16		
DQA1*050101	17	18	
DQA1*050102	19	20	
DQA1*0502	21		
DQA1*0503	22		
DQA1*0504	23		
DQA1*0505	24		
DQA1*060101	25	26	15
DQA1*060102	27		

出証特2005-3006388



表3B-1

アリル番号		検出用	のプロ-	- ブ番号	•	
DQB1*050101	0	1	2	3		
DQB1*050102	4					
DQB1*050201	5					
DQB1*050202	6	7	8	4		
DQB1*050301	9	10	4			
DQB1*050302	6	11				
DQB1*0504	7	12				
DQB1*0201	13	14				
DQB1*0202	15	14				
DQB1*0203	16	15				
DQB1*030101	17	18	19	20		
DQB1*030102	17	18				
DQB1*0302	21	22	23	24		
DQB1*030302	18	23	24			-00
DQB1*030303	25	6	26	18	27	23
DQB1*0304	17	22	19	20		
DQB1*030501	28	23				
DQB1*030502	6	22	27	29		
DQB1*0306	26	30				
DQB1*0307	31					
DQB1*0308	21	6	22	29		
DQB1*0309	32			4.0	00	
DQB1*0310	6	18	33	19	20	
DQB1*0311	21	6	22	27	29	00
DQB1*0312	25	21	6	18	27	23
DQB1*0313	34					
DQB1*0401	35					
DQB1*0402	36					
DQB1*060101	37					
DQB1*060102	38					
DQB1*060103	39					
DQB1*0602	40	41	42			
· DQB1*0603	43	41	42			

[0031]



【表9】

表3B-2

アリル番号		検出月	用のプロ	ーブ番号]	
DQB1*060401	27	44				
DQB1*060402	43	45	27	46	47	
DQB1*060501	48	49	27	46	47	
DQB1*060502	48	50	27	46	51	
DQB1*0606	48	49	27	46		
DQB1*0607	43	11	27	46	47	
DQB1*0608	43	45	52			
DQB1*0609	49	27	44			
DQB1*0610	7	41				
DQB1*061101	40	45	11	52		
DQB1*061102	48	49	45	11	41	
DQB1*0612	49	44				
DQB1*0613	40	45	52			
DQB1*0614	43	45	11	41		
DQB1*0615	40	11	27	46	47	
DQB1*0616	53					
DQB1*0617	43	29				
DQB1*0618	48	27	41	0.		
DQB1*0619	25	6	54	11	23	41
DQB1*0620	40	45	11			

[0032]



【表10】

[0033]

表 4 A

アリル番号	烙 山田	ョのプロー	ブ釆号
· · · · · · · · ·	1天山/T 0		ノ 田 ワ
DQA1*010101			
DQA1*010102	1		
DQA1*010201	2		
DQA1*010202	3	2	
DQA1*0103	4		
DQA1*010401	5		
DQA1*010402	6	7	
DQA1*0105	6		
DQA1*0106	8		
DQA1*0201	9		
DQA1*030101	10		
DQA1*0302	11		
DQA1*0303	12		
DQA1*040101	13	14	
DQA1*040102	15		
DQA1*050101	16	17	
DQA1*050102	18	19	
DQA1*0502	20		
DQA1*0503	21		
DQA1*0504	22		
DQA1*0505	23		
DQA1*060101	24	25	14
DQA1*060102	26		



【表11】

表 4 B - 1

アリル番号		検出月	目のプロ	ーブ番号	<u> </u>	
DQB1*050101	0	1	2	3		
DQB1*050102	4	·				
DQB1*050201	5					
DQB1*050202	6	7	8	4		
DQB1*050301	9	10	4			
DQB1*050302	6	11				
DQB1*0504	7	12				
DQB1*0201	13	14				
DQB1*0202	15	14				
DQB1*0203	16	1 5				
DQB1*030101	17	18	19	20		
DQB1*030102	17	18				
DQB1*0302	21	22	23	24		
DQB1*030302	18	23	24			
DQB1*030303	. 25	6	26	18	27	23
DQB1*0304	17	22	19	20		
DQB1*030501	28	23				
DQB1*030502	6	22	27	29		
DQB1*0306	26	30				
DQB1*0307	31					
DQB1*0308	21	6	22	29		
DQB1*0309	32					
DQB1*0310	6	18	33	19	20	
DQB1*0311	21	6	22	27	29	
DQB1*0312	25	21	6	18	27	23
DQB1*0313	34					
DQB1*0401	35					
DQB1*0402	36					
DQB1*060101	37					
DQB1*060102	38					
DQB1*060103	39					
DQB1*0602	40	41	42			
DQB1*0603	43	41	42			
[0034]						



【表12】

表 4 B - 2

アリル番号		検出月	用のプロ	ーブ番号	클	
DQB1*060401	27	44				
DQB1*060402	43	45	27	46	47	
DQB1*060501	48	49	27	46	47	
DQB1*060502	48	50	27	46	51	
DQB1*0606	48	49	27	46		
DQB1*0607	43	11	27	46	47	
DQB1*0608	43	45	52			
DQB1*0609	49	27	44			
DQB1*0610	7	41				
DQB1*061101	40	45	11	52		
DQB1*061102	48	49	45	11	41	
DQB1*0612	49	44				
DQB1*0613	40	45	52			
DQB1*0614	43	45	11	41		
DQB1*0615	40	11	27	46	47	
DQB1*0616	53					
DQB1*0617	43	29				
DQB1*0618	48	27	41			
DQB1*0619	25	6	54	11	23	41
DQB1*0620	40	45	11			



【書類名】要約書

【要約】

【課題】HLA-DQの各アリルを個別に同定するために有用であるプローブセット及び それを用いたHLA-DQのアリルの同定方法を提供すること。

【解決手段】HLA-DQの各アリルに特有の塩基を含む部分配列のすべてを網羅するプ ローブからプローブセットを構成し、これを用いて検体に含まれるHLA-DQを同定す る。

【選択図】 なし



特願2003-43055

出願人履歴情報

識別番号

[000001007]

変更年月日
 変更理由]

氏 名

1990年 8月30日

 更理由]
 新規登録

 住 所
 東京都大

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

キヤノン株式会社